C297-0428

無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

アプリケーションデータ 10

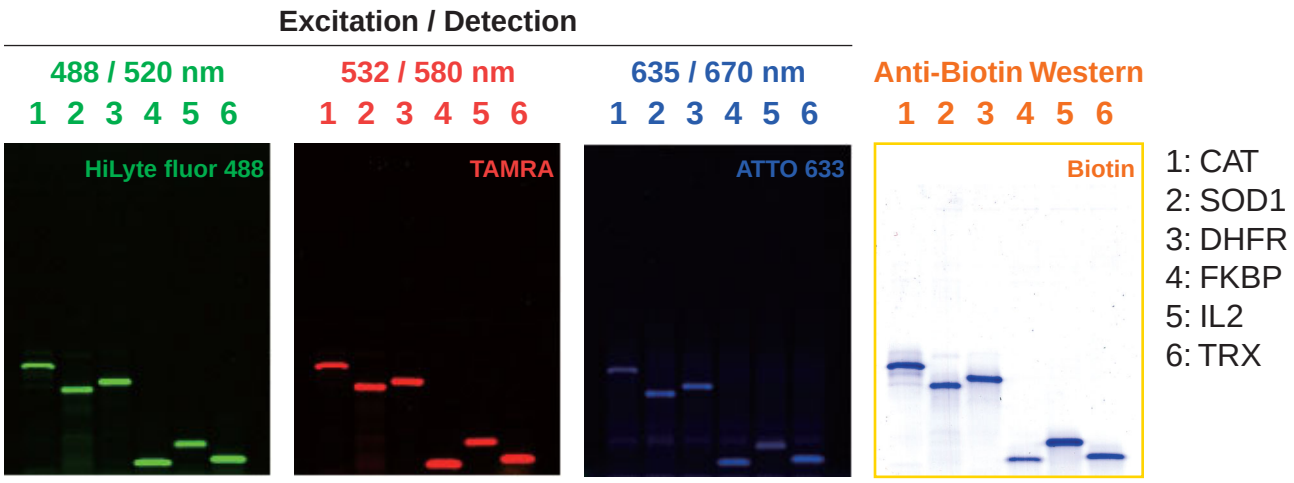
[アンバーコドンを利用した合成タンパク質の部位特異的標識]

これまで大腸菌無細胞タンパク質合成系ではアンバーコドン（TAG）や4塩基コドンを利用した部位特異的標識技術が開発されてきました。この技術により標識されたタンパク質を用いて、1分子蛍光分析（FCS）による相互作用解析、分子間や分子内における蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）解析が行われています。そこで、Transdirectにおいても部位特異的標識が可能であるかどうかをプロテインエクスプレス社より販売されているClover*Direct*™ tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalizationを用いて検討しました。

実験手順

6種類の遺伝子（CAT、SOD1、DHFR、FKBP、IL2、TRX）の開始コドン直下にアンバーコドン（TAG）を導入し（2-amber導入）、pTD1へクローニングした。これより調製したmRNAを用いて翻訳反応を行い、その際に4種類のClover*Direct*™ tRNA（HiLyte Fluor 488、TAMRA、ATTO 633、Biotin）をそれぞれ反応系に添加した。合成反応後、SDS-PAGEにて分離し、3種類の蛍光試薬に関しては蛍光イメージャー、ビオチンについてはウェスタンブロッティングによって、合成タンパク質を検出した。

結　果



※これらのデータは株式会社プロテインエクスプレスより提供

今回検討を行った6種類のタンパク質において、2-amber導入により、3種類の蛍光色素とビオチンの部位特異的標識が確認されました。また、Clover*Direct*™ tRNAを加えない反応を行ったサンプルについては、いずれのタンパク質でも完全長と思われる位置にバンド（非標識タンパク質）は確認されませんでした（データ示さず）。

以上のように、Transdirect *insect cell*とClover*Direct*™試薬を組み合わせることにより、合成タンパク質の効率的な部位特異的標識が可能である事が確認されました。

無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

方 法

・発現ベクターへのクローニング及びmRNAの調製

6種類の蛋白質Chloramphenicol Acetyltransferase（CAT）、Superoxide dismutase（SOD1）、Dihydrofolate reductase（DHFR）、FK506 binding protein（FKBP）、Interleukin 2（IL2）、Thioredoxin（TRX）のコード領域をpTD1にクローニングした。その際、開始コドンの直下にアンバーコドン（TAG）を導入した。その後、キット付属の取扱説明書に従ってmRNAの調製を行った。

・タンパク質合成

タンパク質合成は、Transdirect付属の取扱説明書と同様の方法（10μLスケール）で行った。反応の際に4種類のClover*Direct*™ tRNAをそれぞれ反応系に0.8μL添加した。

Clover*Direct*™ tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization

- Clover*Direct*™ HiLyte Fluor 488（code: CLD01）
- Clover*Direct*™ TAMRA（code: CLD02）
- Clover*Direct*™ ATTO 633（code: CLD03）
- Clover*Direct*™ Biotin（code: CLD04）

Clover*Direct*™の詳細な製品情報につきましては、プロテインエクスプレス社HPを御参照ください。
http://www.proteinexpress.co.jp/

・SDS-PAGEおよび標識タンパク質の検出

反応終了後、各反応液0.5μLを12.5%SDS-PAGEにて分離した。
ビオチン標識の検出は、ウェスタンブロッティングにより行った。蛍光試薬標識の場合は下記検出条件にて検出した。
Scanner: FMBIOⅢ（日立ソフト）
Image Resolution: 50μm

	Excitation / Detection
HiLyte Fluor 488	488 / 520 nm
TAMRA	532 / 580 nm
ATTO 633	635 / 670 nm

技術に関するお問合せは・・・

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット

TEL (075) 823-1351
WEB https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html
E-Mail t-direct@shimadzu-biotech.jp

Transdirect *insect cell* (P/N 292-30000-91)

■キット内容
- Insect Cell Extract（黄）×5本
- Reaction Buffer（青）×1本
- 4mM Methionine（赤）×1本
- 0.5μg/μL Control DNA（白）×1本
- 0.5μg/μL pTD1 Vector（緑）×1本
- 取扱説明書

■反応回数：40回（50μL合成反応系）
■保存温度：−80℃
■価　格：31,185円（税込）

〈ご注意〉・試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。
・概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。
・本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

バルクキット（受注生産のため、詳細はお問い合せください。）

		■価格（税込）
20キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット20 **(P/N 292-30000-92)**	404,250円
50キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット50 **(P/N 292-30000-93)**	924,000円
100キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット100 **(P/N 292-30000-94)**	1,617,000円

バルクキットには、pTD1 VectorとControl DNAは含まれません。

※価格は2008年10月1日現在のものです。
※仕様および価格は改良のため，予告なく変更することがありますので，ご了承ください。

JQA-0376

島津製作所　分析計測事業部　604-8511　京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット
604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1（075）823-1351
http://www.an.shimadzu.co.jp

取次店

3219-06903-10A-IK